

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

17 DEC 2004

(19)世界知的所有権機関
国際事務局



(43)国際公開日
2003年12月24日 (24.12.2003)

PCT

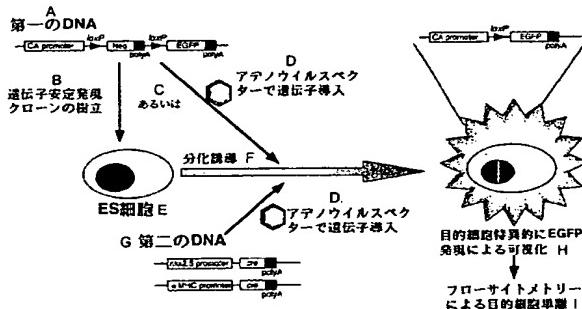
(10)国際公開番号
WO 03/106673 A1

- (51)国際特許分類7: C12N 15/00, 5/06, C12Q 1/04
(52)国際出願番号: PCT/JP03/07536
(53)国際出願日: 2003年6月13日 (13.06.2003)
(54)国際出願の言語: 日本語
(55)国際公開の言語: 日本語
(56)優先権データ:
特願2002-175231 2002年6月17日 (17.06.2002) JP
(57)出願人(米国を除く全ての指定国について): 財団法人名古屋産業科学研究所 (NAGOYA INDUSTRIAL SCIENCE RESEARCH INSTITUTE) [JP/JP]; 〒460-0008 愛知県名古屋市中区栄二丁目10番19号 Aichi (JP).
(72)発明者: および
(73)発明者/出願人(米国についてのみ): 小財 健一郎 (KOSAI,Kenichiro) [JP/JP]; 〒500-8705 岐阜県岐阜市司町40番地 岐阜大学医学部内 Gifu (JP). 高橋 知之 (TAKAHASHI,Tomoyuki) [JP/JP]; 〒500-8705 岐阜県岐阜市司町40番地 岐阜大学医学部内 Gifu (JP).
(74)代理人: 西尾 章 (NISHIO,Akira); 〒501-1203 岐阜県本巣郡本巣町文殊57-122 Gifu (JP).
(81)指定国(国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

[続葉有]

(54) Title: METHOD OF SLECTIVE ISOLATION OR VISUALIZATION OF TARGET CELLS DIFFERENTIATED FROM EMBRYONIC STEM CELLS OR KIT FOR VISUALIZATION

(54)発明の名称: 胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離又は可視化方法及び単離又は可視化用キット



- A..FIRST DNA
B..ESTABLISHMENT OF CLONE WITH STABLE GENE EXPRESSION
C..OR
D..GENE TRANSFER USING ADENOVIRUS VECTOR
E..ES CELL
F..INDUCING DIFFERENTIATION
G..SECOND DNA
H..VISUALIZATION BY EXPRESSING EGFP SPECIFICALLY TO TARGET CELL
I..ISOLATION OF TARGET CELL BY FLOW CYTOMETRY

(57) Abstract: A method of the selective isolation or visualization of target cells differentiated from embryonic stem cells comprising transferring, into the embryonic stem cells, a first recombinant DNA, which has a first promoter, a gene carrying recombinase-recognition sequences at the both ends and a selection marker gene for the target cells differentiated from the embryonic stem cells located in this order in the 5' -side and in

[続葉有]

WO 03/106673 A1

BEST AVAILABLE COPY



(84) 指定国(広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 國際調査報告書

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイドスノート」を参照。

which the selection marker gene is expressed by the first promoter, and a second recombinant DNA which has a second promoter expressed specifically to the target cells differentiated from the embryonic stem cells and a gene expressing recombinase located in this order in the 5' -side; and a kit for isolation or visualization which comprises a first gene transfer vector containing the first recombinant DNA and a second gene transfer vector containing the second recombinant DNA.

(57) 要約: 第 1 のプロモーター、リコンビナーゼ認識配列を両端に有する遺伝子、胚性幹細胞から分化する目的細胞の選択マーカー遺伝子の順に 5' 側から配置され、第 1 のプロモーターが選択マーカー遺伝子を発現させる第 1 の組換え DNA と、胚性幹細胞から分化する目的細胞に対して特異的に発現する第 2 のプロモーター、リコンビナーゼ発現遺伝子の順に 5' 側から配置された第 2 の組換え DNA とを、各々胚性幹細胞に導入する胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離又は可視化方法。第 1 の DNA を含む第 1 の遺伝子導入用ベクターと第 2 の DNA を含む第 2 の遺伝子導入用ベクターとを備えた単離又は可視化用キット。

明細書

胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離又は可視化方法及び単離
又は可視化用キット

5 技術分野

本発明は、胚性幹細胞から分化した目的細胞を効率良く確実に選別し
て単離又は可視化できる方法及びこれに用いる単離又は可視化用キット
に関する。

10 背景技術

胚性幹（Embryonic Stem、ES）細胞（以下、ES細胞ともいう）は、初期胚から分離された細胞で、培養系を操作することにより血球系、心筋、骨格筋、神経などいかなる臓器、細胞にも分化し得る全能性を有するため、これを用いて発生学などの生物学、先端医学の分野などでの研究
15 の進展が大いに期待されている。このような研究のためには、ES細胞から分化した目的細胞を効率良く、確実に選別し、単離する方法の確立が最も重要な課題の一つである。

ところで、従来、分化した目的細胞が特異的な膜蛋白を発現する場合は、その膜蛋白を指標にフローサイトメトリーで目的の細胞を単離する
20 ことが行われている（守田陽平、リンパ球サブセットに対する多重染色
解析：中内啓光監修、田中弥生編、フローサイトメトリー自由自在（細
胞工学 別冊），秀潤社，p60-66 (1999) / Yamashita J, Itoh H,
Hirashima M, Ogawa M, Nishikawa S, Yurugi T, Naito M, Nakao K,
Nishikawa S. Flk1-positive cells derived from embryonic stem
25 cells serve as vascular progenitors. Nature 408(6808): p92-6 (20
00)）。

しかし、この方法が適応できるのは、細胞特異的な分子が膜蛋白とし

て細胞外に発現している場合に限られるため、血球系や血管系などの一部の細胞、臓器に応用が限定されるのが実情であった。

このため心筋細胞のように特異的な膜蛋白が知られていない多くの細胞に対する方策としては、目的の細胞に特異的に発現する分子（遺伝子）
5 のプロモーター領域下にマーカー遺伝子をつないだ組換え遺伝子をES細胞に安定導入し、分化した細胞で特異的に発現するそのマーカーを指標に細胞を選別し、単離する方法が報告されている（Andressen C,
Stocker E, Klinz FJ, Lenka N, Hescheler J, Fleischmann B,
Arnhold S, Addicks K. Nestin-specific green fluorescent protein
10 expression in embryonic stem cell-derived neural precursor cells
used for transplantation. Stem Cells 19(5):419-24 (2001)）。この方法は、組織特異的に発現する遺伝子のプロモーターを使うことにより、薬剤耐性遺伝子を細胞特異的に発現させてその薬剤を用いて目的細胞のみを選別する方法、あるいは特異的な波長の励起光で発色する分子を細胞特異的に発現させることによりフローサイトメトリーで目的の細胞を選別して単離する方法である。

しかし、これらの方法は細胞特異的なプロモーターの活性（発現強度）に著しく左右されてしまうという大きな問題点があり、その応用と効用は非常に限定的であった。すなわち、細胞特異的なプロモーターは特異性はあっても活性が弱い場合、分化した目的細胞を選別、単離するのに十分な強度のマーカー遺伝子の発現が得られず目的細胞を選別できないため、この方法が適応できるものは非常に限定されるというのが実情であった。また、実験を計画をする段階で確実にこの方法が有用であるか否かを予想することは困難で、予想される結果が不確かであるにも拘わらず目的細胞に分化させて単離するためにES細胞株を目的毎に1つ1つ作成し、分化した目的細胞の1つ1つについて検証をしなければならず、多大な労力と時間を使いながら結果として目的細胞を単離できること

があつた。

本発明は、活性（発現強度）が低い組織特異的なプロモーターでもマークー遺伝子を機能させるために十分な量の発現を可能とすることにより、各種動物のES細胞を用いた医学、生物学、バイオテクノロジー分野など様々な研究分野や再生医療において利用可能な分化した目的細胞を確実、簡便かつ迅速に選別単離する方法又は選別可視化する方法及びそれに用いる単離又は可視化用キットを提供する。

発明の開示

10 本発明は、第1のプロモーター、リコンビナーゼ認識配列を両端に有する遺伝子、胚性幹細胞から分化する目的細胞の選択マークー遺伝子の順に5'側から配置され、第1のプロモーターが前記選択マークー遺伝子を発現させる第1の組換えDNAと、胚性幹細胞から分化する目的細胞に対して特異的に発現する第2のプロモーター、リコンビナーゼ発現遺伝子の順に5'側から配置された第2の組換えDNAとを、各々胚性幹細胞に導入することを特徴とする胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離又は可視化方法である。上記発明において、第1の組換えDNA又は第2の組換えDNAの胚性幹細胞への導入を、遺伝子導入用ベクターを用いて行っても良い。この遺伝子導入用ベクターは、アデノウイルスベクターを用いることができる。

また、本発明は、上記発明の第1の組換えDNA及び／又は第2の組換えDNAが導入された胚性幹細胞である。

また、本発明は、上記の第1の組換えDNAを含む第1の遺伝子導入用ベクター又は上記の第2の組換えDNAを含む第2の遺伝子導入用ベクターである。

また、本発明は、上記の第1の組換えDNAを含む第1の遺伝子導入用ベクターと上記の第2の組換えDNAを含む第2の遺伝子導入用ベク

ターとを備えた胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離又は可視化方法に用いる単離又は可視化用キットである。

また、本発明は、上記の第1の組換えDNAが導入された胚性幹細胞と、上記の第2の組換えDNAを含む第2の遺伝子導入用ベクターとを備えた胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離又は可視化方法に用いる単離又は可視化用キットである。
5

また、本発明は、上記の第1の組換えDNAを含む第1の遺伝子導入用ベクターと、上記の第2の組換えDNAが導入された胚性幹細胞とを備えた胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離又は可視化方法に
10 用いる単離又は可視化用キットである。

また、本発明は、上記の胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離方法により得られる細胞又はこの細胞を含む組織である。

また、本発明は、上記の細胞及び／又は組織を用いる疾患の治療法である。

15 本発明の胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的分離又は可視化方法は、各種動物に由来するES細胞に適用ができ、例えばマウス、ラット、サル、ヒトなどすでに樹立されている種は勿論のこと、今後樹立されるであろう他の種のES細胞にも用いることが可能であり、ES細胞の動物種、種類により特に限定されない。

20 ES細胞の取扱いの標準的な方法は、Brigid Hogan他著、山内一也他訳、「マウス胚の操作マニュアル」、近代出版（1997）、あるいは相沢慎一著、「ジンターゲッティング：ES細胞を用いた変異マウスの作製」、実験医学別冊、バイオマニュアルシリーズ8、羊土社（1995）などに記載されている。

25 本発明に用いる第1の組換えDNAとは、第1のプロモーター、リコンビナーゼ認識配列を両端に有する遺伝子、胚性幹細胞から分化する目的細胞の選択マーカー遺伝子とが5'から順に配置されたものを遺伝子組

換え技術により作成したものである。第1のプロモーターとは、選択マークー遺伝子を十分に発現させられない第2のプロモーターより活性が高く、選択マークー遺伝子を発現させるに足るプロモーターであれば特に限定されるものではなく、例えばCA（サイトメガロウイルスエンハンサーとニワトリ β アクチングリッドプロモーター）
5 プロモーターやCMV（サイトメガロウイルス初期遺伝子エンハンサー・プロモーター）プロモーターなどの恒常的強発現プロモーターが好適である。なお、恒常的強発現プロモーターとは、該プロモーターに繋いだ目的遺伝子をES細胞を初めとするほとんどの細胞に導入した場合、目的
10 の遺伝子を恒常的に強く発現させるプロモーターのことをいう。

リコンビナーゼ認識配列は、特異的なDNA組換え酵素であるリコンビナーゼにより認識される塩基配列であれば特に限定されず、リコンビナーゼにより二つのリコンビナーゼ認識配列で挟まれたDNA鎖の切断
15 、置換、結合というDNAの組換え反応を生じるloxPやFRTなどの特異的な塩基配列をいう。

リコンビナーゼ発現遺伝子は、リコンビナーゼを発現する遺伝子で、
loxPを認識するバクテリオファージP1由来のリコンビナーゼCre
20 (Sternberg et al. J. Mol. Biol. Vol. 150, 467-486 (1981))、FRTを認識する酵母(Saccharomyces cerevisiae)由来のリコンビナーゼFLP (Babineau et al., J. Biol. Chem. Vol. 260, 12313-12319 (1985))、チゴサッカロマイセス・ルーイのpSR1プラスミド由来のR (Matsuzaki et al., Mol. Cell. Biol. Vol. 8, 955-962 (1988))を発現する遺伝子などを代表例として挙げることができるがこれらに限定されるものではない。

25 選択マークー遺伝子は、第2の組換えDNAがES細胞に導入された後、第1のプロモーターにより発現しES細胞から分化した目的細胞を特異的に選別するための指標として用いるもので、EGFP (Enhanced Green

Fluorescent Protein) や GFP (Green Fluorescent Protein) などの発光蛋白遺伝子や種々の薬剤耐性遺伝子を挙げることができるが、選択マークとして用い得ればこれらに限定されない。特に、発光蛋白遺伝子は、目的細胞を可視化でき、フローサイトメトリーなどを用いてその選別単離が容易になるのでより好ましい。また、発光蛋白遺伝子は、恒常的強発現プロモーターを用いた場合、分化した目的細胞から更に分化した細胞をも永続的、恒常に標識して可視化できるので、分化系統、組織系統が培養皿上で観察、解析することができる所以、好ましい。

本発明に用いる第2の組換えDNAとは、胚性幹細胞から分化する目的細胞に対して特異的に発現する第2のプロモーター、リコンビナーゼ発現遺伝子が5'から順に配置されたものを遺伝子組換え技術により作成したものである。第2のプロモーターとは、分化する目的細胞でのみ特異的に発現する遺伝子のプロモーター領域のことである。その例としては、心筋細胞のNkx2.5, MEF-2, GATA-4, 心筋型アクチン、心筋型 α ミオシン重鎖 (α -cardiac myosin heavy chain: 以下、 α MHCという) 蛋白、ミオシン軽鎖2v(myosin light chain-2v: MLC2v)蛋白、脳の神経細胞のネスチンnestin、脳のグリア細胞のglial fibrillary acidic protein (GFAP)、より未分化な肝細胞の α フェトプロテイン α -fetoprotein (AFP)、(成熟した) 肝細胞のアルブミンalbumin、骨髄芽細胞のオステオカルシンosteocalcin、胰臓 β 細胞の臍・十二指腸ホメオボックス遺伝子1pancreatic and duodenal homeobox gene 1 (PDX-1)、血管(内皮細胞)のflt-1、表皮ケラチン細胞のケラチン14keratin14 (K14)、骨格筋細胞の筋クレアチニンキナーゼmuscle creatine kinaseなどの遺伝子のプロモーターが挙げられる。これらのプロモーターに繋がれたリコンビナーゼ発現遺伝子は、ES細胞がその目的細胞に分化したときに限定してリコンビナーゼを発現する。

ES細胞への第1の組換えDNAあるいは第2の組換えDNAの導入に

は、それぞれの組換えDNAと共に薬剤耐性遺伝子を有するプラスミドをエレクトロポレーション法、リン酸カルシウム法、リポソーム法、DAEデキストラン法などの分子生物学の一般的な方法で導入して、その後、薬剤添加培地で細胞を1-2週間培養することにより、染色体にこれらの組換えDNAが組み込まれ安定かつ永続的に遺伝子を発現するES細胞のクローンを採取して、分化の実験に用いることができる。さらに有用な方法として、第1の組換えDNAあるいは第2の組換えDNAを含む遺伝子導入用ベクターをそれぞれ作成し、これにより簡便かつ非常に効率的にES細胞に組換えDNAを導入することができる。遺伝子導入用ベクターの例としては、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノアソシエートベクター、センダイウイルスベクターなど、非ウイルスベクターとして、カチオニックリポソーム、HVJリポソームなどが挙げられるが、これらに限定されない。

15 次に、本発明の胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離又は可視化方法の原理を典型的な例を用いて第1図を参照しながら説明する。

第1の組換えDNAは、第1のプロモーター(図中、CAプロモーター)、リコンビナーゼ認識配列としてloxP配列、ES細胞から分化した目的細胞の選択マーカーとしてEGFP遺伝子が5'側から順に配置され、2つのloxP配列間にマーカーのNeo遺伝子とポリAシグナルが配置され、EGFP遺伝子の下流には、ポリAシグナルが配置されている。なお、リコンビナーゼ認識配列間に配置されるマーカーは、Neo遺伝子に限定されるものではなく、様々なマーカー遺伝子を用いることができる。また、ポリAシグナルも特に限定されず、牛成長ホルモンのポリAシグナル、ラビット β -グルビンポリAシグナルなど様々なポリAシグナルを用いることができる。

また、第2の組換えDNAは、第2のプロモーター(図中、Nkx2.5遺

伝子プロモーター又は α MHC遺伝子プロモーター)、リコンビナーゼCreの順で5'側から配置されている。リコンビナーゼCreの下流には、ポリAシグナルが配置されている。

第1の組換えDNAと第2の組換えDNAが導入されたES細胞が、目的の細胞に分化誘導されることにより第2のプロモータが発現し、リコンビナーゼCreが作用してloxP配列で囲まれた部分が切り出されると、第1のプロモーターによりEGFP遺伝子が強く発現し、蛍光を指標にして目的細胞の心筋細胞を可視化でき、フローサイトメトリーなどにより簡便かつ容易に選別単離することができる。

10

図面の簡単な説明

第1図は、本発明の胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離又は可視化方法を模式的に示す説明図である。第2図は、アデノウイルスベクターによる遺伝子導入効率を示す蛍光顕微鏡写真像である。(a) 15 フィーダー細胞上で培養したマウスES細胞(R1細胞)の蛍光顕微鏡写真像 (b) フィーダー細胞無しで培養したマウスES細胞(D3細胞)の蛍光顕微鏡写真像 (c) 分化誘導中のマウスES細胞(D3細胞)の蛍光顕微鏡写真像。なお、(a)～(c)は、MOI100でAd.CMV-LacZを感染させ、x-gal染色したものであり、各蛍光顕微鏡写真像の右上はその位相差顕微鏡写真像を示す。第3図は、アデノウイルスベクターによる遺伝子導入効率を示すグラフである。(a) 各MOIでアデノウイルスベクターによるES細胞(R1細胞)の遺伝子導入効率を示すグラフである。(b) 各MOIでアデノウイルスベクターによるES細胞(D3細胞)の遺伝子導入効率を示すグラフである。 第4図は、本発明の胚性幹細胞から分化した20 目的細胞の選別的単離又は可視化方法によりEGFPで可視化されたES細胞の蛍光顕微鏡写真像である。(a) 陰性コントロールとして、Ad.CMV-LacZを感染させたもので、EGFPの発現はない。(b) 陽性コントロール

として、Ad. CA-LacZを感染させたもので、遺伝子導入効率に一致して、60～70%位の細胞がEGFPの発現により可視化されている。(c) Ad. Nkx2.5-Creを第4日に感染させ、第6日に観察したもので、目的細胞と思われる細胞が散在して可視化されている。(d) Ad. α MHC-Creを第13日に観察したもので、目的細胞と思われる細胞が可視化されている。第5図は、Ad. CMV-LacZ、Ad. Nkx2.5-Cre及びAd. α MHC-Creの発現を指標に単離された細胞のフローサイトメトリーのチャートである。第6図は、(a) Ad. Nkx2.5-Cre、(b) Ad. α MHC-Creの発現を指標に単離された細胞の免疫細胞染色の蛍光顕微鏡写真像である。(a) 左の写真像がEGFP、中央の写真像が目的の蛋白の発現を示しており、上段はSMA、下段はトロポミオシン(TM)で、それぞれに対する特異的な抗体により免疫蛍光染色したものである。また、右の写真像は左の写真像と中央の写真像を重ね合わせた写真像で、EGFPと目的の蛋白が同じ細胞で発現していることを示している。(b) 左の写真像がEGFP、中央の写真像が目的の蛋白の発現を示しており、上段は α MHC、下段はアクチニンで(いずれも心筋細胞特異的な分子)、それぞれに対する特異的な抗体により免疫蛍光染色したものである。また、右の写真像は左の写真像と中央の写真像を重ね合わせた写真像で、EGFPと目的の蛋白が同じ細胞で発現していることを示している。第7図は、恒常的強発現プロモーターのCAプロモーター及び組織特異的遺伝子のNkx2.5プロモーターと α MHCプロモーターにより発現したリコンビナーゼCreの電気泳動像を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を実施例により詳細に説明する。なお、比較例、実施例のプラスミド、DNA、各種酵素、大腸菌、培養細胞などを取り扱う遺伝子工学技術ならびに細胞培養技術などは、特に断らない限り、
「Current Protocols in Molecular Biology, F. Ausubelら編、(1994),

John Wiley & Sons, Inc.」並びに「Culture of Animal Cells; A Manual of Basic Technique, R. Freshney編、第2版(1987), Wiley-Liss」に記載の方法に準じて行った。また特に断りがない限り、ES細胞の培養、取り扱いに関しては前述のBrigid Hogan他著、山内一也他訳、
5 「マウス胚の操作マニュアル」、近代出版(1997)、あるいは相沢慎一著、「ジンターゲッティング：ES細胞を用いた変異マウスの作製」、実験医学別冊、バイオマニュアルシリーズ8、羊土社(1995)に記載の方法、アデノウイルスの一般的な取り扱いに関しては特に断りがない限り、Frank L. Graham著、Manipulation of adenovirus vectors, Chapater
10 11. p109-p128、；E. J. Murray編、Methods in Molecular Biology, Vol. 7: Gene Transfer and Expression Protocols (1991)、アデノウイルスの作成については、Chen, S-H. et al., Combination gene therapy for liver metastases of colon carcinoma in vivo. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (1995) 92, 2477-2581.、あるいはMizuguchi
15 et al, Human Gene Ther., Vol. 9, 2577-2583, (1998) に記載の方法に準じて行った。

[比較例]

以下、従来の胚性幹細胞の単離方法を比較例として記載する。
Nkx2.5遺伝子プロモーターは、Yutzey氏より供与を受けたものを使用
20 した。Yutzeyらは、Nkx2.5遺伝子の5' 上流のゲノム解析により、Nkx
2.5遺伝子の心筋特異的な発現調節を可能とするプロモーター領域について詳しい検討を行っている（詳細は、Development. Vol. 125, 4461-4470 (1998)に記載）。これによると転写開始点より5' 上流の-3059bp
まで含む領域が、Nkx2.5遺伝子の心筋特異的に十分な発現レベルで発現
25 するための最適なプロモーター領域として働くことが確認されている。

ちなみに、これより短い領域、つまり転写開始点より5' 上流-959bp
まで、あるいは逆にこれより長い領域、つまり転写開始点より5' 上流-

- 9000bpでも、心筋特異的に十分な発現レベルでこの下流の遺伝子を発現させることはできないことが上記の論文で示されている。このNkx2.5遺伝子の転写開始点より5' 上流の-3059bpの領域、マーカー遺伝子の大腸菌のlacZ遺伝子、SV40 small t-intronとpolyA signalがプラスミド
- 5 pBlueScript SKに挿入されたpNkx2.5-IA-LacZプラスミドをYutzey氏より供与を受けた（詳細は上記Development. Vol. 125, 4461-4470 (1998) に記載）。pNkx2.5-IA-LacZ（論文での記載名は-3059Nkx2.5lacZ）は心筋細胞特異的にLacZ遺伝子を発現することが確認されている。
- 次いで、プラスミドのpEGFP-C1(クロンテック社、カタログ番号6084-
- 10 1)から制限酵素のNheIとBclI処理によりEGFP (enhanced green fluorescent protein) 遺伝子を切り出し、切り出したEGFP遺伝子の両末端をT4 DNAポリメラーゼIにより平滑化した。pNkx2.5-IA-LacZを制限酵素のSalIで切断し、T4 DNAポリメラーゼIで末端を平滑化し、自己ライゲーションを防ぐためCalf Intestine Phosphatase(CIP)酵素で末端
- 15 脱リン酸化処理した後、切り出したEGFP遺伝子とT4 DNAリガーゼで反応させライゲーション反応を行い、プラスミドpBS-Nkx2.5-EGFPを作成した。
- 一方、プラスミドpBS-loxP-Neoは、プラスミドpBS246 (旧GIBCO BRL社、現Invitrogen社、カタログ番号10348-019) のリコンビナーゼ認
- 20 識配列のloxP配列2個の間のマルチクローニングサイト中のHindIII-BamHI間に、5' 側よりpGKプロモーター、Neo遺伝子 (G418薬剤耐性遺伝子)、bovine growth hormoneのpoly A signalの順で連結された遺伝子を挿入することにより作成した。このプラスミドpBS-loxP-Neoを制限酵素のNotIで切断しCIP処理を行い精製したものと、pBS-Nkx2.5-EGFPを
- 25 NotIで切り出した遺伝子断片（転写開始点から-3059までのNkx2.5プロモーター、EGFP遺伝子、SV40 small t-intronとpolyA signalが連結された遺伝子）とを、T4 DNAリガーゼで反応させ、pNkx2.5-EGFP-loxP-

Neoを作成した。pNkx2.5-EGFP-loxP-Neoは、pBluescriptのバックボーンを持ち、5'側よりNkx2.5遺伝子プロモーター（転写開始点から-3059まで）、EGFP遺伝子、SV40 small t-intronとpolyA signal、loxP配列、pGKプロモーター、Neo遺伝子、bovine growth hormoneのpoly A signal、5 loxP配列が順に挿入されたプラスミドである。

このプラスミドpNkx2.5-EGFP-loxP-NeoをマウスES細胞株のR1細胞にエレクトロポレーション法（バイオラド社のGene Pulser IIで、0.2mmのcuvetteで150mV、950μFで通電）により遺伝子導入して、翌日より薬剤選択のための抗生素のG418を150 μg/mlの濃度でLIF(マウスleukemia inhibitory factor)の組換え蛋白:旧GIBCO BRL社、現Invitrogen社、商品名ESGRO) 添加のES細胞用培地に加え、1-2週間後にコロニーが十分に分離できたところで、この薬剤耐性のES細胞株クローンをとった。3回の実験によりG418耐性のクローンを78個採取した。

尚、ES細胞用培地は、Dulbecco's Modified Eagle's Medium (high glucose条件、L-glutamine, 110mg/L sodium pyruvateが含有：シグマ社)に、NaHCO₃、125 μM 2-mercaptoethanol (ナカライ社)、非必須アミノ酸 (Invitrogen社)、核酸、20%胎児牛血清 (Invitrogen社)、ストレプトマイシン、ペニシリソウを加えたものである。なお、ES細胞の未分化能を維持する際はこのES細胞用培地に10³ U/mLでLIFを加えて培養し、20 ES細胞の分化誘導の際はこのES細胞用培地単独でLIFは添加しないで培養する。

これらのクローンES細胞からDNAを抽出し、ゲノミックPCRを行い、EGFPを増幅するために設計したプライマーで25クローン陽性、連結されたNkx2.5遺伝子プロモーターとEGFPを含む領域を増幅するために設計したプライマーで16クローン陽性、さらにこの両者のプライマーセットでいずれも陽性だったものが13クローンであった。少なくともこの13クローンは正しく目的の遺伝子が導入されていると考えられるため、以降の

実験にはダブルポジティブのこの13クローンを用いた。

上記の13クローンのES細胞を2つの分化誘導系にのせた。一つの系はES細胞を細胞非接着の皿でLIF非添加のES細胞用培地で浮遊させて培養することにより、embryoid bodyと呼ばれる初期胚と似た細胞塊が形成された。このembryoid bodyを3日目（LIFを除いた分化誘導開始から3日後）から接着の培養皿に移しLIF非添加のES細胞用培地で接着状態で培養すると、7日目（LIFを除いた分化誘導開始から7日後）位から14日目にかけて、生体の心筋細胞のように自己拍動する細胞塊が出現してきた。

もう一つの系はST2細胞というマウス間質細胞の上にES細胞をのせてLIF非添加のES細胞用培地で共培養する分化誘導系である。これもLIFを除いてこのST2細胞の上にES細胞をのせて7～9日後位より、生体の心筋のように自動収縮する細胞塊がところどころに出現してきた。

この2つの分化系に載せて7日後から14日後までの各日の細胞塊からRNAを抽出し、RT-PCR法を行うと、心筋特異的な遺伝子（Nkx2.5、 α MHC、MLC2vなど）の発現誘導が確認された。また同時期の細胞塊の免疫染色により筋特異的や心筋特異的な蛋白質（ α アクチニン、トロポミオシン、Nkx2.5、MLC2v）などの発現も確認でき、これらの自動収縮する細胞塊が心筋細胞に分化していることが証明された。

一方、この4日後から14日後の心筋に分化した細胞塊から抽出したRNAからEGFP遺伝子のmRNAをRT-PCR法で増幅しても、いずれにおいても陽性の所見はみられなかった。そしてこれらのES細胞から分化した心筋細胞塊は、いずれのES細胞クローンから誘導されたものも、蛍光顕微鏡で可視化することも、またセルソーターで単離可能なレベルの明らかなEGFPの発現もみられなかった。前述のように、このNkx2.5遺伝子プロモーター（-3059）は、Yutzeyらが、Development. Vol. 125, 4461-4470 (1998)で報告しているものと同様のものであり、このプロモーターに繋い

だ遺伝子は、マウスの発生において早期より心臓の予定領域に発現し、心筋細胞に比較的特異的に発現することが確認されたものである。

Yutzeyらが用いたLacZ遺伝子の発現を組織のx-gal染色で検出する方法は酵素反応であるため検出感度は比較的高く、検出に必要なLacZ遺伝子の発現レベルは非常に微量で良いものの、細胞を生きたままで可視化、単離するためにはLacZ遺伝子をマーカー遺伝子として用いることができない。そのため、このような目的にはEGFP遺伝子をマーカー遺伝子として用いるのが一般的であるが、一方EGFPを蛍光顕微鏡で可視化させたりセルソーターで分離するためにはある程度のEGFP遺伝子の発現量が必要である。つまりこの遺伝子が正しく組み込まれて、またES細胞が心筋に分化したにも関わらずEGFPの発現がみられないのは、このNkx2.5遺伝子プロモーターに繋がれた遺伝子は心筋特異的な発現は生じても、EGFPを可視化できるレベルの発現活性を持たないためである。このように、従来法では目的の細胞に分化した心筋細胞をNkx2.5遺伝プロモーターからEGFP遺伝子を発現させることで可視化し、また、セルソーターで単離するという試みはいずれも不可能であった。

[実施例 1]

5' 側より、CMVプロモーター (human cytomegalovirus immediate early promoter) あるいはCAプロモーター (cytomegarovirus enhancer+ chicken β -actin promoter)、その下流に2つのloxP配列で囲まれた Neo遺伝子、さらにその下流のマーカー遺伝子にEGFP遺伝子を配置した第1の組換えDNAを含むプラスミドpCMV-loxP-Neo-EGFPならびにpCA-loxP-Neo-EGFPを作成したが、その作成過程を以下に記載する。

まずpcDNA3プラスミド(Invitrogen社)を制限酵素のBclIとBsmIで処理してNeo遺伝子を切り出し、その断端をT4 DNAポリメラーゼI処理により平滑末端化する(インサート)。pBS246プラスミド(旧GIBCO BRL社、現Invitrogen社)を制限酵素のHindIIIとBamHIで切断しCIP処理する(ベ

クター)。このインサートとベクターの両者をT4 DNAリガーゼで反応させライゲーションすることで、pBS246のloxP配列の間にneo遺伝子が挿入されたプラスミドのpBS-loxP-Neoを得た。

次に、このpBS-loxP-Neoを制限酵素NotIで切り出し、T4 DNAポリメラーゼIで処理し、2つのloxP配列とそれに囲まれたNeo遺伝子の遺伝子断片を回収した(インサート)。一方、CMVプロモーターが導入されているプラスミドpIRES-EGFP(クロントック社、カタログ番号#6064-7)を制限酵素ClaIとBamHIで処理し、MCS(マルチクローニングサイト)、IVS(synthetic intron)、IRES(internal ribosome entry site)を除いたベクター部分を回収し、これをT4 DNAポリメラーゼIで末端平滑化した(ベクター)。このインサートとベクターの両者をT4 DNAリガーゼでライゲーションすることにより、目的の一つのプラスミドpCMV-loxP-Neo-EGFPを得た。

さらにプラスミドpCMV-loxP-Neo-EGFPをBglIIとEcoRIで処理しCMVプロモーター部を除き、T4 DNAポリメラーゼIで断端を平滑末端化、CIP処理をした(ベクター)。一方、コスミドpAdex1Cawt(タカラ社、コード番号6150)をPmeIとSwaIで処理して、CAプロモーター部を切り出し、T4 DNAポリメラーゼIで断端を平滑末端化した(インサート)。このインサートと前記ベクターの両者をT4 DNAリガーゼで反応させライゲーションを行い、もう一つの目的プラスミドpCA-loxP-Neo-EGFPを得た。

プラスミドpCMV-loxP-Neo-EGFPあるいはpCA-loxP-Neo-EGFPを別々にES細胞(D3細胞)にエレクトロポレーション法にて遺伝子導入し、150 μg/mL G418と10³ U/L LIF添加したES細胞用培地にて1-2週間培養することにより、ES細胞クローンを単離した。これらの手技は比較例の項で詳しく述べた通りである。pCMV-loxP-Neo-EGFPを遺伝子導入したクローンを70個、pCA-loxP-Neo-EGFPを59個採取した。

また、5'側より、Nkx2.5プロモーター(-3059)、リコンビナーゼのCre

遺伝子、bovine growth hormone poly A signalを配置した第2の組換えDNAを作成し、さらにその遺伝子を含むアデノウイルスベクターAd.Nkx2.5-Creを下記のように作成した。

- まずプラスミドpHCMV6 (Mark Kay氏より供与：プラスミドの詳細はH. Mizuguchi and M. Kay: Human Gene Ther vol. 10: 2013-201 (1999)に記載、現在、クロントック社より販売) をNheIとMunIで処理してCMVプロモーターを除いた後にT4 DNAリガーゼでライゲーションを行った。さらにこのプラスミドをAflIIで切断しT4 DNAポリメラーゼIで断端の平滑末端化を行い(ベクター)、この場所にプラスミドpBS185 (旧GIBCO BRL社、現Invitrogen社) よりXhoIとMluIでCre遺伝子を切り出してT4 DNAポリメラーゼIで平滑末端化したインサートを、T4 DNAリガーゼでライゲーション反応をおこない挿入し、プラスミドpHMΔp-Creを得た。つまりpHMΔp-Creは、プロモーターを持たず、任意のプロモーターを簡単に挿入するためのマルチクローニングサイトを持ち、その下流にCre遺伝子、bovine growth hormone poly A signalを持つプラスミドである。

- 比較例で記載したpNXK2.5-IA-LacZをNotIとXbaIで切り出しT4 DNAポリメラーゼで平滑末端化したNkx2.5遺伝子プロモーター部分(インサート)を、pHMΔp-CreをNotIで切断しT4 DNAポリメラーゼIで平滑末端化しLCIP処理したベクターに、T4 DNAリガーゼでライゲーションし、プラスミドpHM-Nkx2.5-Creを得た。

- さらにpHM-Nkx2.5-CreをI-CeuI、PI-SceIで切断したインサート、ならびにアデノウイルスベクタープラスミドpAdHM4 (Mark Kay氏より供与：プラスミドの詳細はH. Mizuguchi and M. Kay: Human Gene Ther vol. 10: 2013-201 (1999)に記載) をI-CeuI、PI-SceIで切断したベクターを、T4 DNAリガーゼでライゲーションすることにより、アデノウイルスベクタープラスミドpAdHM4-Nkx2.5-Creを得た。pAdHM4-Nkx2.5-CreをPacIで切断し精製したものを293細胞に遺伝子導入し、10-14日後に出

現したアデノウイルスAd. Nkx2.5-Creのブラークを回収し、これを293細胞でウイルスの増幅を行い、CsClの密度勾配法による精製、カラムによる脱塩を行った(方法の詳細は最初に記載した引用文献、著書に記載)。

このAd. Nkx2.5-Creはヒト5型アデノウイルスベクターで、細胞に感染、
5 遺伝子導入後はNkx2.5遺伝子プロモーターの制御下にCre遺伝子を発現する。

また同様の方法でpHMΔ p-CreにCAプロモーターを挿入して、同様の方法でアデノウイルスベクターAd. CA-Creを作成した。Ad. CA-Creはヒト5型アデノウイルスベクターで、細胞に感染、遺伝子導入後はCAプロモーターの制御下にCre遺伝子を発現する。CAプロモーターはES細胞を含むほとんどの細胞で、下流の遺伝子を恒常に強く発現させることができたため、Ad. CA-Creを感染させた細胞はその分化状態に関わらず細胞内で恒常にCre酵素を発現する。

次に、アデノウイルスベクターのES細胞に対する遺伝子導入効率を調べた。まずCMVプロモーターの制御下にLacZ遺伝子を発現するヒト5型アデノウイルスベクターAd. CMV-lacZを前述の方法で作成した。Ad. CMV-LacZを各MOI (multiplicity of infection; 感染可能なウイルス数／細胞数) で感染させ、 x-gal 染色で陽性細胞の割合を評価したところ、MOIを上げるに従い遺伝子導入効率は上昇した(第2図、第3図参照)。そしてR1、D3のいずれのES細胞でも、またフィーダー細胞有り、無しのいずれの状態でも、30 MOIで多くの細胞に遺伝子が導入でき、100から300 MOIで100%のES細胞に遺伝子を導入することができた。しかし、余りにも極端にMOIを上げすぎると細胞障害がみられることがあるため、細胞障害がほとんどみられずに約60-80%の細胞に遺伝子導入ができる30 MOIで後述する実験を行った。同様に前述の分化誘導をかけたES細胞に十分量のAd. CMV-LacZを感染させて x-gal 染色で評価すると、いずれの分化段階でも、分化誘導後1-14日目のいずれの日でも、大差なく大部分の

細胞に遺伝子を導入することができた（第2図c参照）。このようにアデノウイルスベクターを使うことで、ES細胞に簡単に高率にいずれの分化段階でも遺伝子を導入することが確認できた。特に分化誘導中はエレクトロポレーション法などの従来の一般的な遺伝子導入法では遺伝子導入することが困難であるため、アデノウイルスベクターの使用は非常に有用であることが分かった。

第1の組換えDNAが組み込まれたpCMV-loxP-Neo-EGFPが安定導入されたES細胞の70クローンのうち、まず34個をEGFPを増幅する比較例で設計したプライマーセットによるゲノミックPCRを行ったところ、そのうちの31個が陽性であった。またこの31個のES細胞クローンにAd. CA-Creを感染させたところ、4クローンが蛍光顕微鏡による観察で十分な発現強度をもって可視化された（この4クローンはいずれもEGFPのゲノミックPCRで陽性）。つまりゲノミックPCRでEGFP遺伝子の挿入を確認せずとも、直接Ad. CA-Cre感染でスクリーニングする方が、より発現の強いクローンを迅速に選別できるため、以降は得られたES細胞クローンは直接Ad. CA-Cre感染によるEGFPの発現強度により、目的のクローンを選別することにした。pCMV-loxP-Neo-EGFPが安定導入された残りの34クローンをAd. CA-Cre感染後の（蛍光顕微鏡での観察による）EGFP発現強度でスクリーニングしたところ、11クローンがEGFP強発現、4クローンがEGFP弱発現であった。つまり、pCMV-loxP-Neo-EGFPが安定導入された合計70クローンから15クローン（弱い発現もいれると19クローン）の目的のものを採取できた。

一方、pCA-loxP-Neo-EGFPが安定導入された59クローンのES細胞を、Ad. CA-Cre感染後のEGFP発現で直接スクリーニングしたところ、16クローンがEGFP強発現する目的のものであった。

pCMV-loxP-Neo-EGFPとpCA-loxP-Neo-EGFPがそれぞれ安定導入されたES細胞は、いずれもAd. CA-Creを感染しない場合、あるいはCre遺伝子を

発現しないコントロールのAd. CMV-LacZの感染をした場合、EGFPの可視レベルの発現はなく問題となるバックグラウンドはなかった。またAd. CA-Creを感染させた後のpCMV-loxP-Neo-EGFPとpCA-loxP-Neo-EGFPがそれぞれ安定導入されたES細胞のEGFPの発現レベルは、いずれにおいてもpCA-loxP-Neo-EGFPの方が強かった。これは多くの細胞株で報告されてきたのと同様に、ES細胞においてもCMVプロモーターよりCAプロモーターの方が強発現を誘導できるという、それぞれのプロモーター活性の違いによると思われる。しかし pCMV-loxP-Neo-EGFPが導入されたES細胞でも可視レベルのEGFPの発現が得られ、さらに感度がいいセルソーターでの解析と単離を目的とした実験にはpCMV-loxP-Neo-EGFPでも本質的には問題ないと考えられる。本実験例での以下の分化誘導の実験には、より発現が強く蛍光顕微鏡下での観察がより明確に解析がより容易に行えるという点で、pCA-loxP-Neo-EGFPを用いて行った。

前述のように、pCA-loxP-Neo-EGFPが安定導入されCre酵素の発現後にloxPで挟まれたNeo遺伝子が切り出されてEGFPの強発現が保証された15クローンのES細胞のうち、3個のクローンを用いてAd. Nkx2.5-Creを用いた分化誘導の実験を行った。前述のAd. CA-Creを用いた予備実験で、Ad. CA-Cre感染1日後より十分に可視化されるレベルのEGFPの発現がみられ、感染2日後で最大の発現レベルに達し、それ以降同レベルのEGFPの持続発現が得られることが確認された。

比較例で既に述べた、embryoid bodyを介した分化誘導系にこの3クローンのES細胞を使用してみた。まず、この分化誘導系でのNkx2.5 mRNAの発現をRT-PCRで毎日調べたところ、分化誘導5日目よりNkx2.5の発現が明らかにみられた。このため分化誘導後4日目に分化中のES細胞にAd. Nkx2.5-Creを30 MOIで感染させた。つまり、1日にLIF非添加のES細胞用培地で培養し非接着状態でembryoid bodyの作成を初め、分化誘導開始後3日目に培養皿に接着させ、4日目にAd. Nkx2.5-Creを30 MOIで感染さ

せた。分化誘導開始後5日目より蛍光顕微鏡下で所々にEGFPが可視化できる細胞が出現し、分化誘導開始後6日目より蛍光顕微鏡下で非常に強い発現レベルのEGFP発現が観察され、このEGFPの発現は以降もずっと見られた（第4図C参照）。6日目、あるいは8日目でトリプシンにより細胞塊をばらばらにし、一個ずつの細胞に十分分離した後、セルソーターにてEGFPを発現する目的細胞を単離した。このフローサイトメトリーの解析では、Ad. Nkx2.5-Creを感染させた群の陽性率、つまりNkx2.5発現細胞は約2%であった（第5図参照）。一方これに対し、陽性コントロールとしてAd. Nkx2.5-Creの代わりにAd. CA-Creを感染させた群での陽性率は（則ちこれはアデノウイルスが感染しCre遺伝子を導入した細胞の割合を表すものである）、約60%であった（第5図参照）。また一方陰性コントロールとしてAd. Nkx2.5-Creの代わりにAd. CMV-LacZを感染させた群、あるいはアデノウイルスベクターを全く感染させなかつた群での陽性率は（則ちこれはpCA-loxP-Neo-EGFPの遺伝子が安定導入されているES細胞での、Cre酵素によるloxPが切りだされていない状態でのEGFP発現の漏れ、バックグラウンド）0-0.2%であった（第4図a、第5図参照）。

すなわちこの実験系では、非常に高率に約60%の細胞に正しく目的の遺伝子が導入されており、またバックグラウンドがなく、正しく目的のNkx2.5発現細胞を可視化し、さらに単離できるということで、従来不可能だったこれらの技術を解決した非常にすぐれた実験系であることが分かった。

次いで、単離された細胞はすぐに培養皿に蒔いて培養し、翌日、あるいは数日後にその細胞の性格、形質について解析を行った。まず単離された細胞のEGFP遺伝子の発現は、翌日から数日後も、大部分の細胞において蛍光顕微鏡ではっきりと確認できるくらいの強いEGFPの発現を示していた。これにより、この方法で単離された細胞が非常に高純度で目的の細胞であることが分かった。次に細胞の性格、形質の解析のため、こ

の細胞からRNAを抽出しRT-PCR法により、Nkx2.5遺伝子の発現、心筋特異的な分子、並びにその他関連の遺伝子の発現を調べた。あるいは、これらの単離細胞の免疫細胞染色を行い、これらの分子の発現を調べた。

まずNkx2.5遺伝子、 α MHC、MEF2c（心筋特異的転写因子）、GATA4（心筋に頻度が高く発現する転写因子）は、80%の細胞で明らかな発現がみられた。この結果よりこの細胞の多くは心筋細胞であることが分かった。

一方、20-30%の細胞に、心筋以外のマーカーの平滑筋型アクチン（smooth muscle actin: SMA）、トロポミオシン（tropomyosin: TM）の発現もみられた（第6図a参照）。ES細胞からNkx2.5を発現する細胞のみを確実に（しかも蛍光顕微鏡でも可視化できるレベルで確実に）単離できた報告はこれまでになく、Nkx2.5は今まで分かっている心筋特異的遺伝子の中で心筋の発生過程で最も早期に発現する転写因子であることを考えると、本細胞の一部が心筋以外のマーカーを発現するという結果は、本細胞が今までにES細胞から単離されたことのない、成熟心筋細胞以前の分化段階の心筋細胞、さらには心筋芽細胞とでもいべき心筋への分化が運命付けられているより未分化な細胞の可能性もある。そのため、この単離された細胞自身が、特に未だ十分に解明されていない初期の心臓の発生や、分化、再生に関する今後の基礎研究、ES細胞を使った心疾患への再生医療法開発について非常に有用なものと考えられる。

また、心筋の各分化段階で発現する様々な心筋特異的遺伝子はMEF2CやGATA4など幾つか報告されており、今後本方法を用いることでこのような遺伝子の発現を指標に心筋の各分化段階の細胞を自由に単離することが可能であり、本法の発明の意義は大きい。さらに本法の有用性は心筋に限定されるものではなく、組織特異的、あるいは性格が同定された種々遺伝子のプロモーターを用いれば、ES細胞から分化するいかなる特異的な分化段階の各組織も、ある遺伝子の発現に特化したいかなる目的の細胞も可視化でき、単離することが可能である。この点から、本発明

は、ES細胞を用いた再生医学、発生学において極めて重要な意義を持つものである。

[実施例 2]

本発明に用いる第2のプロモーターは、Nkx2.5遺伝子プロモーターに限られるものではなく、その他の心筋特異的遺伝子を指標にしたES細胞由来の心筋細胞、あるいはES細胞由来の他の細胞や組織を蛍光顕微鏡下で可視化し、さらに単離する目的で一般化することに広く用いることが可能である。つまり第2のプロモーターさえ目的のものに置換する事で、いかなるES細胞由来の目的細胞をも可視化し単離できる。このような本発明の広い一般的な有用性をさらに確認するために、第2のプロモーターにマウスの α MHC遺伝子プロモーターを用いたアデノウイルスベクターAd. α MHC-Cre、つまりこれは α MHCが発現する心筋細胞に特異的にCre酵素を発現するような組換え遺伝子を導入するアデノウイルスベクターであるが、これを実施例1と同様の方法で作成して同様の実験を行った。

Ad. α MHC-Creは以下のようにして作成した。まずシンシナチー医科大学(University of Cincinnati, College of Medicine)のJeffrey Robbins氏より供与された、 α MHCプロモーターが挿入されているプラスミド(プラスミドの詳細は、J. Biol. Chem. Vol. 266, p9180-9185(1991)に記載)から、BamHIとSalIで α MHC遺伝子プロモーターを含む約5.5kbのDNAを切り出し、T4 DNAポリメラーゼIで末端を平滑化し、精製、抽出した。これはRobbins氏らが上記文献で報告しているように、心臓型 β ミオシン重鎖遺伝子の3'側の最後のエクソンの一部、 α MHCの3'領域ならびに蛋白をコードしない最初の三つのエクソンを含むDNAであり、この領域が心臓特異的な発現をもたらすプロモーターとして働くことが同論文で示されている。一方実施例1で作成したベクターのpHMΔp-CreをNotI酵素で切断し、T4 DNAポリメラーゼIで末端を平滑化し、CIP酵素で末端脱リン酸化処理して精製した。これを前述の α MHC遺伝子

プロモーターの5.5kbのDNA断片とともに、T4 DNAリガーゼ酵素で反応させライゲーション反応を行い、 α MHC遺伝子プロモーターの下流にCre遺伝子が繋がれたプラスミドpHM- α MHC-Creを作成した。このpHM- α MHC-CreとアデノウイルスベクタープラスミドpAdHM4を実施例1で記載した
5 ように、制限酵素のI-CeuI、PI-SceIで切断した後、両プラスミドをT4 DNAリガーゼでライゲーションすることにより、pAdHM4- α MHC-Creを得た。pAdHM4- α MHC-CreをPacIで切断し精製したものを293細胞に遺伝子導入し、10-14日後に出現したアデノウイルスAd. α MHC-Creのplaquesを回収し、実施例1に記載したものと同様にウイルス増幅、精製、脱塩
10 をおこなった。このように作成されたAd. α MHC-Creは、細胞に感染、遺伝子導入後は、 α MHC遺伝子プロモーターの制御下にCre遺伝子を発現するものである。

実施例1で作成したpCA-loxP-Neo-EGFPが安定導入されたES細胞クローニング株の中で、Creの発現後にEGFPが強く発現することが確認されたES細胞クローニング株を用いて、Ad. Nkx2.5-Creの代わりにAd. α MHC-Creを用いて実施例1と同様の実験を行った。基本的な実験プロトコール、手技は実施例1で記載したのものと同じであるが、ただ実施例1では、Ad. Nkx2.5-Creを分化誘導後4日目に感染させて6日目に可視化された目的細胞をセルソーターで単離させていたところを、本実施例ではAd. α MHC-Creを
20 9日目に感染させて13日目に可視化された目的細胞をセルソーターで単離することにした。これは分化誘導開始後のES細胞の内因性の α MHC遺伝子の発現をRT-PCR法や免疫組織化学で調べたところ、 α MHCの発現は約8日目から14日目にかけて顕著にみられたためである。ES細胞の分化におけるこの α MHCの発現時期の結果は、 α MHCは心筋特異的収縮蛋白の
25 一つであるため成熟した心筋細胞で発現が強くみられるという生体内での事実と一致するものであり、また心筋様の拍動を示すES細胞のコロニーも分化誘導後9-14日目に最も顕著にみられるということもこれと合致

する所見である。このようにAd. α MHC-Creの感染の時期以外の点では、実施例1と全く同じように以下の実験を行った。

Ad. α MHC-Cre感染後1日目（分化誘導後9日目）より、一部の細胞にEGFPの発現が蛍光顕微鏡下で認められ、感染後2日目（分化誘導後10日目）からはっきりとし、それ以降発現はやや増強し、感染後4日目（分化誘導後13日目）にはEGFPの発現は最大となつたため、この時にトリプシンで細胞をばらばらにし、セルソーターでEGFP陽性細胞を単離した（第4図d参照）。単離された細胞はほとんどEGFPを発現していた。さらにこれらの細胞の特性を確証するために、RT-PCRと免疫染色により、
10 α MHC、アクチニンなどの心筋特異的分子のmRNAと蛋白の発現を調べたところ、単離されたほとんどの細胞でこれらの心筋特異的分子の発現は陽性であった（第6図b参照）。さらに、電子顕微鏡の観察で横紋筋繊維構造などの心筋細胞に特有な細胞構造も確認できた。そして何といつても、培養皿に接着させて培養して翌日から数日間、細胞の心筋様の拍動
15 が観察されたことは、単離された細胞が目的の成熟した心筋細胞であることを示している。これらの結果より、単離された細胞は成熟した心筋細胞であることが確認できた。このように本法により、Nkx2.5は転写因子で α MHCは収縮蛋白というように、二つの性格の異なる遺伝子のプロモーターを用いて、実施例1で比較的未熟な分化段階の心筋細胞を、そして実施例2で成熟した心筋細胞を、確実に単離できたことから、本発明が広く一般化して用いられ、有用であることが確認された。
20

[実施例3]

実施例1では第1の組換えDNAが安定導入できたES細胞クローンを最初に取り、そのES細胞に分化誘導過程で第2の組換えDNAをアデノウイルスベクターにより遺伝子導入するという方法を用いたが、実施例25 3ではES細胞クローンを取るといった作業をすることなしに、第1の組換えDNAも第2の組換えDNAも分化誘導過程のES細胞にアデノウイ

ルスベクターを使って直接遺伝子導入した。

このためまず、第1の組換えDNAを遺伝子導入できるアデノウイルスベクターを以下のように作製した。

- まず実施例1で作成したpCA-loxP-Neo-EGFP、pCMV-loxP-Neo-EGFPから
5 SallI酵素処理により、5'側よりCAプロモーター、リコンビナーゼ認識配列のloxP配列で囲まれたneo遺伝子、ポリA配列、EGFP遺伝子、ポリA配列が繋がった目的のDNA断片を切り出した。一方、アデノウイルスを作成するシャトルベクターのpHM5プラスミド（Mark Kay氏より供与：プラスミドの詳細はH. Mizuguchi and M. Kay: Human Gene Ther vol.
10 10: 2013-2017 (1999)に記載、マルチクローニングサイトの両端にそれぞれI-CeuIとPI-SceIの制限酵素認識配列を有する）は、マルチクローニングサイトのSallI認識配列をSallI酵素で切断し、CIP酵素で末端脱リン酸化処理し、これと上記の切り出された目的のDNA断片とを、T4 DNAリガーゼ酵素でライゲーションすることにより、目的の第1の組換えDNA
15 が挿入されたシャトルベクタープラスミドpHM-CA-loxP-Neo-EGFP、pHM-pCMV-loxP-Neo-EGFPを各々得た。さらに、このpHM-CA-loxP-Neo-EGFP、pHM-pCMV-loxP-Neo-EGFPからI-CeuI、PI-SceI酵素で目的の遺伝子部分を切り出し、実施例1でも述べたように、I-CeuI、PI-SceI酵素処理されたアデノウイルスベクタープラスミドのpAdHM4とともに、T4
20 DNAリガーゼでライゲーションすることで、目的の第1の組換えDNAを持つアデノウイルスベクタープラスミドpAdHM4-CA-loxP-Neo-EGFP、pAdHM4-pCMV-loxP-Neo-EGFPを各々作成した。

アデノウイルスベクターの作成は実施例1で述べたように行った。つまり、pAdHM4-CA-loxP-Neo-EGFP、pAdHM4-pCMV-loxP-Neo-EGFPをPacI酵素処理後に293細胞にトランスフェクションし、得られたウイルスプラーグを増幅、精製、脱塩して、目的の第1の組換えDNAを含むアデノウイルスベクターAd.CA-loxP-Neo-EGFP、Ad.CMV-loxP-Neo-EGFPを得た。

実施例1でも述べたように、本実施例の目的には、CAプロモーターでもCMVプロモーターでも本質的な差はないが、より発現が強いということで以下には、Ad. CA-loxP-Neo-EGFPを用いた実験結果を示す。但し、Ad. CMV-loxP-Neo-EGFPでも同様の実験を行い、同様の結果が得られるこ
5 とは確認されている。

全く遺伝子が導入されていないES細胞(D3)を用い、実施例1と同様に、LIFを除いた培地でembryoid bodyを作成することで分化誘導を行った。

まずNkx2.5を指標とした、ES細胞由来のより未分化な心筋細胞の単離には、4日目にAd. Nkx2.5-CreとAd. CA-loxP-Neo-EGFPの2つのアデノウイルスベクターをそれぞれ30 MOIで感染させ、6日目にセルソーターで目的のEGFP発現細胞を単離した。つまり本実施例が実施例1と異なるのは第1の組換えDNAをアデノウイルスベクターを使って遺伝子導入したことのみである。この実験の結果、実施例1と同様の細胞が単離され、これらの細胞は実施例1と同様の遺伝子の発現パターンを示した。
10

次に α MHC遺伝子を発現するES細胞由来の成熟心筋細胞の単離には、実施例2と同様に分化誘導第9日目に、Ad. α MHC-CreとAd. CA-loxP-Neo-EGFPの2つのアデノウイルスベクターをそれぞれ30 MOIで感染させ、第13日目にセルソーターで目的のEGFP発現細胞を単離した。この実験結果も、実験2と同様の細胞が単離され、これらの細胞は同様の心筋特徴的
20 な遺伝子の発現パターンや心筋細胞様の収縮を示した。

この2つの実験結果より、第1の組換えDNAも第2の組換えDNAもアデノウイルスを使って遺伝子導入することで、従来の遺伝子導入安定発現細胞を取って行う方法と同様の結果が、より簡単に得られることが確認できた。

実施例1及び実施例2で示したように、従来の技術で第1の組換えDNAを安定発現するES細胞を作成し、良好なクローンを選んでおいて、これに第2の組換えDNAをアデノウイルスで遺伝子導入するという方
25

法と、実施例 3 のように両方の D N A をアデノウイルスを使って遺伝子導入する方法は、いずれも本発明における意義において本質的な差はない一方、それぞれの利点は目的によって使い分けが有用と考えられる。

二つの D N A の遺伝子導入にアデノウイルスベクターを用いる利点を
5 まとめると以下のようになる。

(1) 第 1、第 2 の組換え D N A が安定導入され恒常発現するクローンを取る煩わしい作業の労力、時間を必要としない：つまり実施例 1、2 で示したように、従来の方法で第 1 の組換え D N A を導入し安定的に恒常発現するクローンを選んで取るには、労力も時間も必要とする。さら
10 に全くアデノウイルスベクターを使用せず従来の技術だけで遺伝子導入して、第 1 と第 2 の組換え D N A の両方を安定的に恒常発現するクローンを選んで取るとすると、さらなる時間と労力を要することになる。この場合それに加え、2 種類の異なる薬剤耐性遺伝子を必要とすることになり、これらの多重薬剤耐性遺伝子発現、またそのクローンを選択する
15 煩雑な作業や長期の薬剤使用による ES 細胞への影響、つまり細胞の性格の変化など、問題となる可能性があり、またこのような種々の影響で目的的のクローンがとれない場合さえもある。

(2) アデノウイルスベクターは分化段階の任意な時期に高率に簡単に目的遺伝子を導入できる：これは従来の技術では不可能なことであった
20 が、アデノウイルスを使えば簡単にできることを、本発明で示した。この利点として、(1) で記載したこととも関連するが、ES 細胞に不要な遺伝子や薬剤の長期間の暴露などの、不要な影響を与えない。

(3) アデノウイルスベクターは、宿主細胞（この場合 ES 細胞）に導入遺伝子を episomal (染色体に組み込まれることなく核内に存在) の形で
25 安定して長期間発現させるため、安定した結果が得られる：従来の方法で、染色体に目的の遺伝子が組み込まれた ES 細胞クローンを薬剤耐性遺伝子を利用して取って来る方法の場合、これらの導入遺伝子が染色体に

ランダムに組み込まれるため染色体上で組み込まれた場所の影響、クロマチン構造の影響などを受ける。このため必ずしも組み込まれた遺伝子が全て安定して発現するわけではないため、(1)に記載したように導入遺伝子を安定発現する良好なクローンを選択してくるのに時間と労力を要する。さらにES細胞では、他の癌細胞株や初代正常培養細胞などを用いた場合に比べ、染色体に組み込まれた導入遺伝子の発現が不安定になりやすいこと、例えば導入遺伝子の発現がシャットオフされる場合もあることが知られている。これに対しアデノウイルスベクターで遺伝子を導入した場合、episomalであるため、このような染色体やクロマチンの影響をうけにくく、安定した発現が得られ、再現性のある安定した結果がいつも得られる。

(4) 任意のES細胞株を用いることができる：ES細胞株の種類、またそのクローンやサブクローンによって分化能、性格が異なっている。この場合、ある細胞の単離には、よりその細胞へ分化しやすいことが同定されているES細胞株のクローンを特に指定して使用したい場合が考えられる。実施例3の第1と第2の組換えDNAを遺伝子導入できるアデノウイルスベクターを用いれば、それぞのES細胞株やクローンについて安定細胞株を作成する必要がなく、自由に望みのES細胞を使用して行うことができる。

(5) ES細胞以外にも簡単に遺伝子導入できるため、作成した第1の組換えDNAの特異性を他の細胞で直接的に確認することができる。また他の細胞での実験へも、この遺伝子構築したものが簡単に応用できる。

[実施例4]

前述したように、実施例で使用したNkx2.5遺伝子プロモーター及び α MHC遺伝子プロモーターの特異性は既に確認されており、また実際の実験結果でも心筋細胞を単離できることは明らかとなつたが、さらに上記の(5)の観点から、実施例3の二つのアデノウイルスで導入したDN

Aが正しく目的の心筋細胞を特異的に可視化できていることを直接的に証明する目的で、この二つのアデノウイルスをマウスの初代心筋培養細胞に感染させてみた。

出生1日目の新生児マウスより心筋を取り出し、これをコラゲナーゼ5で消化して心筋細胞を単一細胞に分離した後、培養皿に巻いて培養した。

この初代心筋細胞培養の手技は、Khalid MA et al. Circ. Res. 72, p725-736 (1993)、ならびにWang L et al. Circ. Res. 79, p79-85 (1996) に記載された方法に基本的に従って行った。このように培養して2日目の心筋細胞に、Ad. Nkx2.5-CreとAd. CA-loxP-Neo-EGFPをそれぞれ10 5MOIで感染させて、感染72時間後に蛍光顕微鏡下で観察したところ、遺伝子が導入された心筋細胞がEGFP陽性として可視された。同様のプロトコードで、Ad. α MHC-CreとAd. CA-loxP-Neo-EGFPを同じように感染させても、遺伝子導入された心筋細胞はEGFP陽性として可視された。これらの二つのアデノウイルスベクターを他の心筋以外の数種類の培養細胞15 (HeLaヒト子宮頸癌細胞、MKN28ヒト胃癌細胞、LL2マウス肺癌細胞、LM8マウス骨肉腫細胞など) に感染させて、その特異性を検証したが、いずれの細胞でもこのようなEGFPの発現は蛍光顕微鏡でみられなかった。このように実施例1、2、3で用いた第1の組換えDNAと第2の組換えてDNAは、遺伝子導入されると明らかに心筋細胞のみを標的化して20 EGFPで可視化できていることが直接的に証明された。

また、恒常的強発現プロモーターのCAプロモーター及び組織特異的遺伝子のNkx2.5プロモーターと α MHCプロモーターのプロモーター活性を調べるための実験を行った。すなわち、以下のアデノウイルスベクターを感染効率(MOI) 30か500で感染させたマウス初代培養心筋細胞と25 NIH3T3マウス線維芽細胞株を用いてウエスタンプロット解析(Cre抗体)を行った(図7参照)。CAはAd. CA-Creを感染させ5 μ gの蛋白を泳動、CA'はAd. CA-Creを感染させ0.5 μ gの蛋白を泳動、CA''はAd. CA-Creを感

染させ $0.1\mu g$ の蛋白を泳動、NCは陰性コントロールでno Ad, $5\mu g$ の蛋白を泳動、Nkx2.5はAd. Nkx2.5-Creを感染させ $5\mu g$ の蛋白を泳動、 α MHCはAd. α MHC-Creを感染させ $5\mu g$ の蛋白を泳動、Tublin（心筋細胞や線維芽細胞で分泌される蛋白）は内因性のコントロールとして、抗Tublin抗体を用いて検出した。図7から、CAプロモーターは $5\mu g$ の蛋白を用いる場合は勿論のこと、10倍希釈したCA' と 50倍希釈したCA'' でもリコンビナーゼCreが検出されているが、Nkx2.5プロモーターと α MHCプロモーターはいずれも $5\mu g$ の蛋白でも非常に微量が検出されに過ぎなかった。これにより、組織特異的遺伝子のNkx2.5プロモーターと α MHCプロモーターのプロモーター活性は非常に弱く、本発明によってのみ、EGFPなどの選択マーカーを発現させられることが分かる。

産業上の利用分野

本発明の胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離又は可視化方法は、単離される各種の細胞、組織を用いて、発生学、再生医学、その他の分子生物学的研究に広く有用であるだけでなく、これらの目的細胞を用いた、心筋梗塞、脳梗塞を始めとする種々の難治性疾患への将来の再生医療の開発にも非常に有用である。また、永続的、恒常に分化した目的細胞から更に分化した細胞をも標識して可視化できるので、分化系統、組織系統が培養皿上で観察、解析することが可能となる。胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的な単離又は可視化は、単離又は可視化用キットを用いることにより一層簡便に行うことができる。

本発明は、発明の実質的範囲に包含される限り、上記の実施例に制限されるものではない。

請求の範囲

1. 第1のプロモーター、リコンビナーゼ認識配列を両端に有する遺伝子、胚性幹細胞から分化する目的細胞の選択マーカー遺伝子の順に5'側から配置され、第1のプロモーターが前記選択マーカー遺伝子を発現させる第1の組換えDNAと、胚性幹細胞から分化する目的細胞に対して特異的に発現する第2のプロモーター、リコンビナーゼ発現遺伝子の順に5'側から配置された第2の組換えDNAとを、各々胚性幹細胞に導入することを特徴とする胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離又は可視化方法。
10
2. リコンビナーゼ認識配列が、loxPである請求の範囲第1項に記載の胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離又は可視化方法。
3. 第1のプロモーターが、恒常的強発現プロモーターである請求の範囲第1項に記載の胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離又は可
15 視化方法。
4. 恒常的強発現プロモーターが、CMVプロモーター又はCAプロモーターである請求の範囲第3項に記載の胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離又は可視化方法。
5. 選択マーカー遺伝子が、蛍光蛋白遺伝子である請求の範囲第1項に
20 記載の胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離又は可視化方法。
6. リコンビナーゼ発現遺伝子が、リコンビナーゼCre発現遺伝子である請求の範囲第1項に記載の胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離又は可視化方法。
7. 第2のプロモーターが、Nkx2.5遺伝子プロモーター又は α MHC遺伝
25 子プロモーターである請求の範囲第1項に記載の胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離又は可視化方法。
8. 第1の組換えDNAの胚性幹細胞への導入が、第1の遺伝子導入用

ベクターを用いて行われることを特徴とする請求の範囲第1項に記載の胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離又は可視化方法。

9. 第1の遺伝子導入用ベクターが、ウイルスベクターである請求の範囲第8項に記載の胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離又は可視化方法。
5

10. ウイルスベクターが、アデノウイルスベクターである請求の範囲第9項に記載の胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離又は可視化方法。

11. 第2の組換えD N Aの胚性幹細胞への導入が、第2の遺伝子導入
10 用ベクターを用いて行われることを特徴とする請求の範囲第1項に記載の胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離又は可視化方法。

12. 第2の遺伝子導入用ベクターが、ウイルスベクターである請求の範囲第11項に記載の胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離又は可視化方法。

15 13. ウイルスベクターが、アデノウイルスベクターである請求の範囲第12項に記載の胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離又は可視化方法。

14. 請求の範囲第1項に記載の第1の組換えD N Aが導入された胚性幹細胞。

20 15. 請求の範囲第1項に記載の第2の組換えD N Aが導入された胚性幹細胞。

16. 請求の範囲第1項に記載の第1の組換えD N Aと第2の組換えD N Aとが各々導入された胚性幹細胞。

17. 胚性幹細胞が、マウスに由来する請求の範囲項14～請求項16
25 のいずれかに記載の胚性幹細胞。

18. 請求の範囲第8項に記載の第1の組換えD N Aを含む第1の遺伝子導入用ベクター。

19. ウイルスベクターである請求の範囲第18項に記載の第1の遺伝子導入用ベクター。
20. ウイルスベクターが、アデノウイルスベクターである請求の範囲第19項に記載の第1の遺伝子導入用ベクター。
- 5 21. 請求の範囲第11項に記載の第2の組換えDNAを含む第2の遺伝子導入用ベクター。
22. ウイルスベクターである請求の範囲第21項に記載の第2の遺伝子導入用ベクター。
- 10 23. ウイルスベクターが、アデノウイルスベクターである請求の範囲第22項に記載の第2の遺伝子導入用ベクター。
24. 請求の範囲第18項に記載の第1の遺伝子導入用ベクターと、請求の範囲第21項に記載の第2の遺伝子導入用ベクターとを備えた胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離又は可視化方法に用いる単離又は可視化用キット。
- 15 25. 第1の遺伝子導入用ベクターと第2の遺伝子導入用ベクターがウイルスベクターである請求の範囲第24項に記載の胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離又は可視化方法に用いる単離又は可視化用キット。
26. ウイルスベクターが、アデノウイルスベクターである請求の範囲20第25項に記載の胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離又は可視化方法に用いる単離又は可視化用キット。
27. 請求の範囲第14項に記載の胚性幹細胞と、請求の範囲第21項に記載の第2の遺伝子導入用ベクターとを備えた胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離又は可視化方法に用いる単離又は可視化用キット。
- 25 28. 第2の遺伝子導入用ベクターがウイルスベクターである請求の範囲第27項に記載の胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離又は

可視化方法に用いる単離又は可視化用キット。

29. ウイルスベクターが、アデノウイルスベクターである請求の範囲第28項に記載の胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離又は可視化方法に用いる単離又は可視化用キット。

5 30. 請求の範囲第18項に記載の第1の遺伝子導入用ベクターと、請求の範囲第15項に記載の胚性幹細胞とを備えた胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離又は可視化方法に用いる単離又は可視化用キット。

31. 第1の遺伝子導入用ベクターがウイルスベクターである請求の範囲第30項に記載の胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離又は可視化方法に用いる単離又は可視化用キット。

32. ウイルスベクターが、アデノウイルスベクターである請求の範囲第31項に記載の胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離又は可視化方法に用いる単離又は可視化用キット。

15 33. 請求の範囲第1項に記載の胚性幹細胞から分化した目的細胞の選別的単離又は可視化方法により得られる細胞。

34. 細胞が、第2のプロモーターとしてNkx2.5遺伝子プロモーターを用いて得られる細胞である請求項33記載の細胞。

35. 細胞が、第2のプロモーターとして α MHC遺伝子プロモーターを用いて得られる心筋細胞である請求の範囲第33項に記載の細胞。

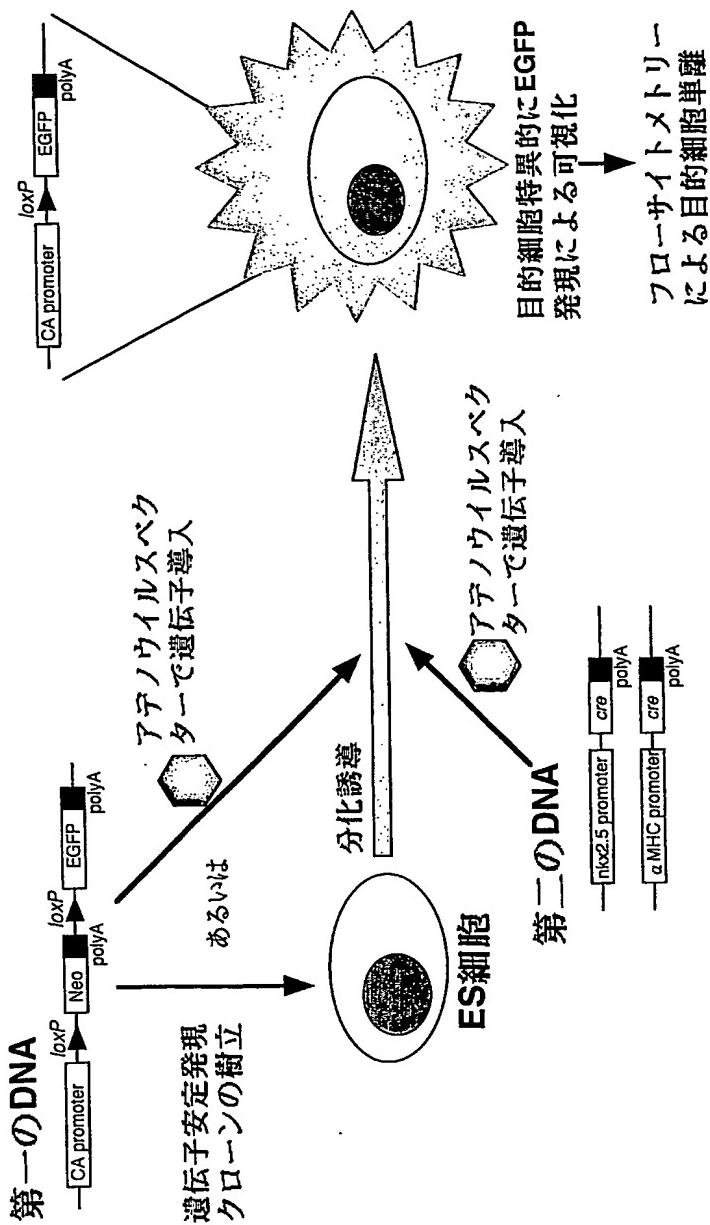
36. 請求の範囲第33項に記載の細胞を含む組織。

37. 請求の範囲第33項に記載の細胞及び／又請求の範囲第36項に記載の組織を用いる疾患の治療法。

38. 疾患が、心疾患である請求の範囲第37項に記載の疾患の治療法。

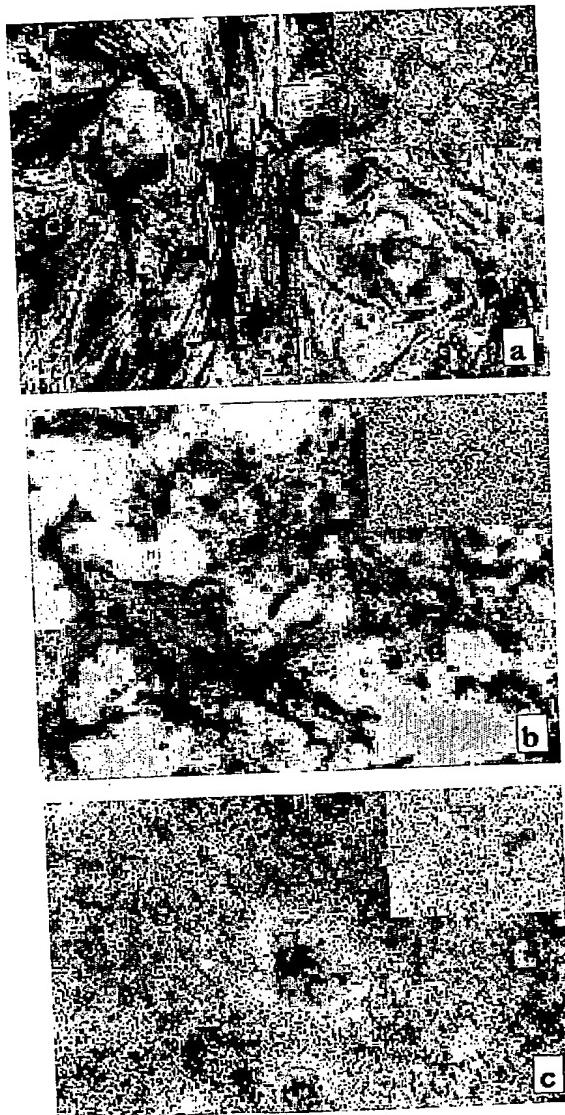
1 / 5

第1図



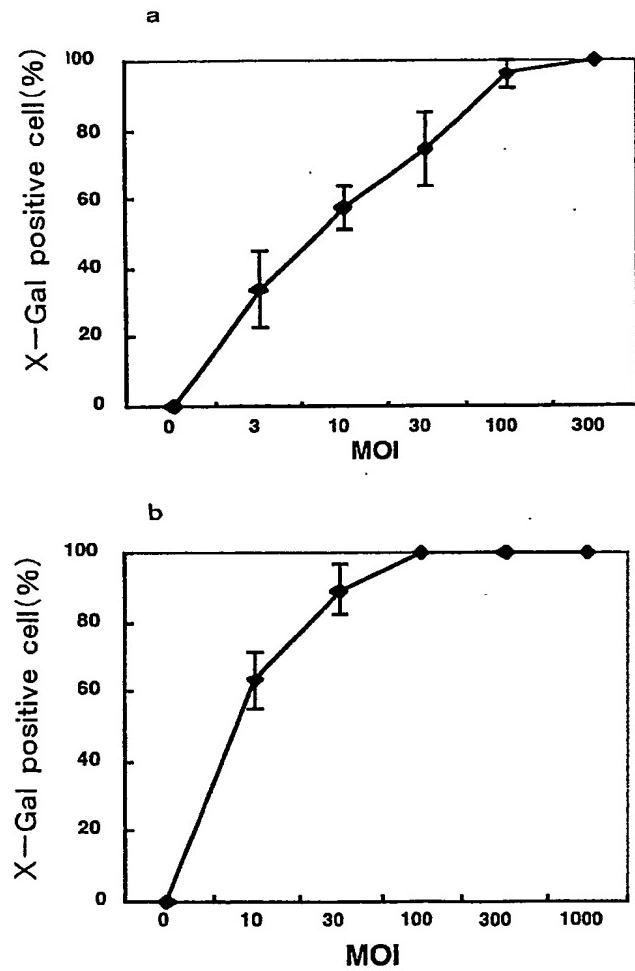
2 / 5

第2図



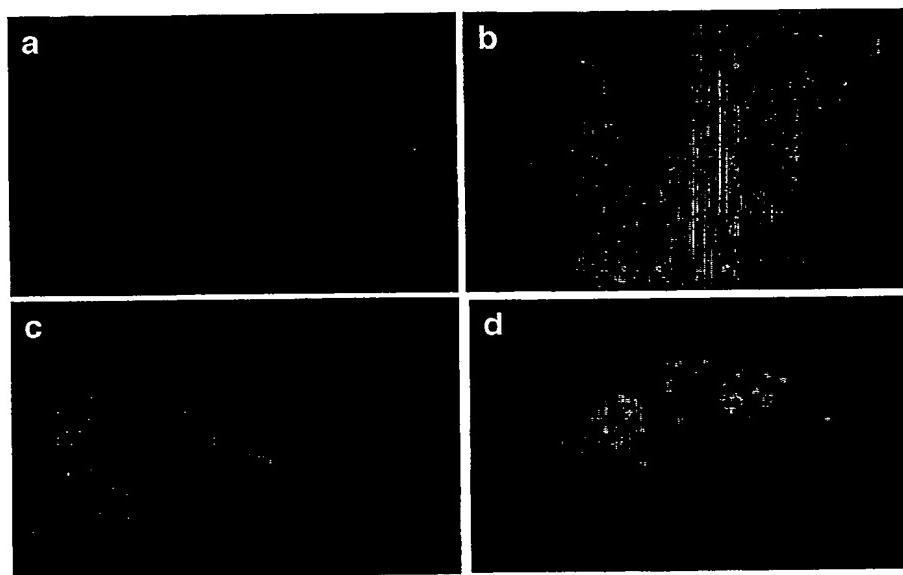
3 / 5

第3図

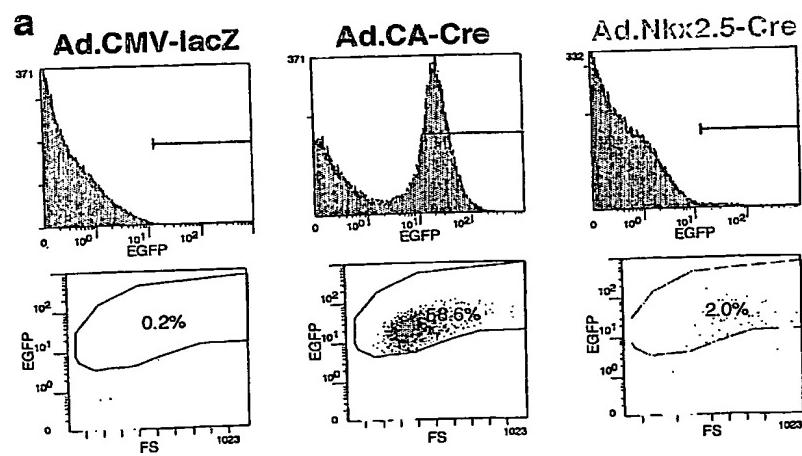


4 / 5

第4図

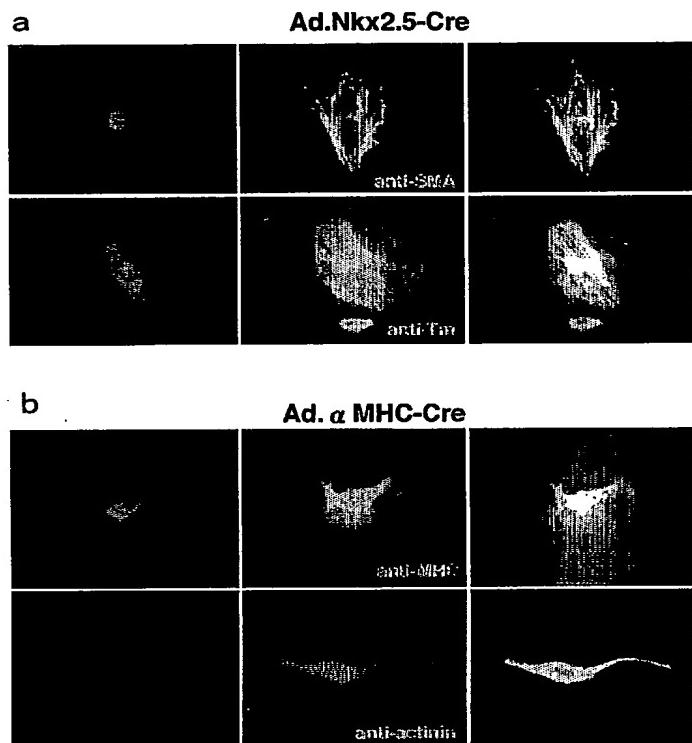


第5図

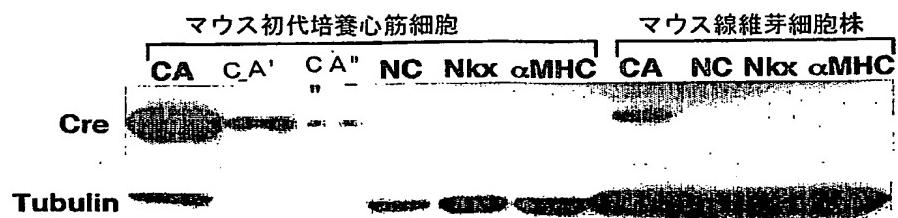


5 / 5

第6図



第7図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/07536

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl' C12N15/00, 5/06, C12Q1/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl' C12N15/00, 5/06, C12Q1/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CA/BIOSIS/WPIDS/MEDLINE (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| X | Kimi ARAKI et al., "Efficiency of Recombination by Cre Transient Expression in Embryonic Stem Cells: Comparison of Various Promoters", The Journal of Biochemistry, 1997, Vol.122(5), pages 977 to 982, full text | 1-36 |
| X | Ludovic Vallier et al., "An efficient system for conditional gene expression in embryonic stem cells and in their in vitro and in vivo differentiated derivatives", Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 2001, Vol.98(5), pages 2467 to 2472, full text | 14, 18-20, 33-36 |
| X | EP 704534 A2 (Sumitomo Pharmaceuticals Co., Ltd.), 03 April, 1996 (03.04.96), Claims; examples & JP 8-84589 A & US 5717492 A | 21-23 |

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

| | | | |
|-----|---|-----|--|
| "A" | Special categories of cited documents: document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance | "T" | later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention |
| "E" | earlier document but published on or after the international filing date | "X" | document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone |
| "L" | document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) | "Y" | document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art |
| "O" | document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means | "&" | document member of the same patent family |
| "P" | document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | | |

| | |
|--|---|
| Date of the actual completion of the international search 16 September, 2003 (16.09.03) | Date of mailing of the international search report 30 September, 2003 (30.09.03) |
|--|---|

| | |
|--|--------------------|
| Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office | Authorized officer |
| Facsimile No. | Telephone No. |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/07536

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| X | Christian Andressen et al., "Nestin-Specific Green Fluorescent Protein Expression in Embryonic Stem Cell-Derived Neural Precursor Stem Cells, 2001, Vol.19, pages 419 to 424, full text | 33, 36 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/07536

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 37–38

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 37 to 38 pertain to methods for treatment of the human body or animal body by surgery or therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.

2. Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP03/07536

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

Int.Cl' C12N15/00, 5/06, C12Q1/04

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

Int.Cl' C12N15/00, 5/06, C12Q1/04

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

CA/BIOSIS/WPIDS/MEDLINE(STN)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|---|---------------------|
| X | Kimi Araki et al. "Efficiency of Recombination by Cre Transient Expression in Embryonic Stem Cells: Comparison of Various Promoters" The Journal of Biochemistry, 1997, Vol. 122(5), p. 977-982, 文献全体参照 | 1-36 |
| X | Ludovic Vallier et al. "An efficient system for conditional gene expression in embryonic stem cells and in their in vitro and in vivo differentiated derivatives" Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 2001, Vol. 98(5), p. 2467-2472, 文献全体参照 | 14, 18-20, 33-36 |

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「I」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

16. 09. 03

国際調査報告の発送日

30.09.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

坂崎 恵美子

4 N 9451



電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) 関連すると認められる文献

| 引用文献の カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示 | 関連する 請求の範囲の番号 |
|-----------------|--|------------------|
| X | EP 704534 A2 (Sumitomo Pharmaceuticals Company, Limited) 1996.04.03, 特許請求の範囲及び実施例等参照, & JP 8-84589 A & US 5717492 A | 21-23 |
| X | Christian Andressen et al. "Nestin-Specific Green Fluorescent Protein Expression in Embryonic Stem Cell-Derived Neural Precursor Cells Used for Transplantation" Stem Cells, 2001, Vol.19, p.419-424, 文献全体参照 | 33, 36 |

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. 請求の範囲 37-38 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。

つまり、

請求項37-38は、治療による人体又は動物の体の処置方法に関するものであって、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定によりこの国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。

2. 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.